第26卷 第4期　　昆 虫 学 报　　Vol. 26, No. 4
1983年11月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Nov., 1983

侧孢芽孢杆菌对蛴螬的致病性试验

张书方　万玉玲
(中国科学院动物研究所)
崔景岳　王宝升
(河北省沧州地区农科所)

摘要　实验室培养乳状菌时，分离出一批菌株，经生理生化鉴定，与对照株侧孢芽孢杆菌一致，其特征与乳状菌有显著区别。这些培养菌株注射华北大黑鳃金龟和铜绿丽金龟幼虫，感染率可达90—100%，喂食也有一定致病力。

侧孢芽孢杆菌（*Bacillus laterosporus* Laubach）早在1912年White曾命名为*Bacillus orpheus*，认为它可引起蜜蜂欧洲幼虫腐烂病，但未作描述。至1917年，McCray发现这种细菌是欧洲腐烂病感染蜜蜂后的第二侵染者，并对其生理生化特性作了一些研究。Smith等（1946）认为它是中等需氧芽孢杆菌。Fitz-James等（1958）对该菌的芽孢和伴孢体的形态学及化学组成进行了研究，用相差和电子显微镜观察形态，显示出区别于其它芽孢杆菌的特征。化学组成中P和N含量很高。氨基酸色谱分析反应出：伴孢体有14组茚三酮阳性点，芽孢比伴孢体还多两组。这种侧孢芽孢杆菌作为蛴螬或其它昆虫病源研究的工作，最近60年进展不大。本文主要报道在实验室培养时分离出的一批对蛴螬有一定致病力的侧孢芽孢杆菌菌株，它们的形态学以及生理生化特性与对照株侧孢芽孢杆菌一致，与乳状菌完全不同。

材料与方法

一、菌株　用作实验的分离菌株为0001，0004，0007，0008，0029，0035等。

侧孢芽孢杆菌对照菌株由中国科学院微生物研究所提供。

二、培养基　初次分离曾用5种培养基，控制pH为7.3—7.5。灭菌用8磅20分钟，冷却至50℃左右倒平板，经28℃培养3—5天备用。培养基组成如下（按百分比浓度计算，每100毫升含克数）：

1. 改良Wyss琼脂　DL-酪氨酸0.02，葡萄糖0.2，酵母浸膏0.5，半胱氨酸0.02，$CaCl_2$ 0.05，K_2HPO_4 0.3，KNO_3 0.05，$MgSO_4$ 0.05，V_{B_1} 0.1，琼脂2，蒸馏水100毫升。

2. 在（1）配方中加入0.5豚鼠全血。

3. 在（1）配方中加入10(W/V)全卵。

本文于1982年6月收到。
菌落照片由曹守珍、于延芬同志拍摄。河北农业大学邓加华同志，沧州地区农科所李锁芝、李仲秀、门士成等同志曾参加部分工作，特此一并致谢。

4. J-琼脂 酵母浸膏 1.5，胰化胨 0.5，葡萄糖 0.2，K_2HPO_4 0.3，琼脂 2，蒸馏水 100 毫升。

5. 普通细菌琼脂 牛肉膏 0.3，蛋白胨 0.5，琼脂 2，蒸馏水 100 毫升。

6. 萌发培养基 酵母浸膏 0.5，葡萄糖 0.2，蒸馏水 100 毫升。

7. 生化鉴定用培养基 按照 Gordon (1973) 对 *Bacillus* 属鉴定方法制备。所用试剂，除酵母粉、胰化胨为英国产品外，其余化学药品均为分析纯。

三、接种材料的挑选 在分离蛴螬病原的平皿上长出的特殊菌落作单株分离，用选出的单株作扩大接种材料。

四、生化反应 根据 Gordon (1973) 对 *Bacillus* 属鉴定的内容测定。

五、菌粉制备 用挑出的单株斜面，分别接种在含 J-琼脂的克氏瓶中，经 28—30℃ 培养 5 天后，用灭菌水将菌苔洗下，菌悬液用灭菌碳酸钙吸附，风干，使用前测芽孢数。

六、毒力测定

1. 虫种 从田间采集华北大黑鳃金龟 (*Holotrichia oblita* Fald)、铜绿丽金龟 (*Anomala corpulenta* Mots.)、灰粉鳃金龟 (*Melolontha incanus* Mots.) 以及新疆分布的点蛀犀金龟 (*Oryctes punctipennis* Mots.)、金匠花金龟 (*Cetonia aurata* (C)) 等幼虫，经室内饲养至少一周后，挑选健壮幼虫供试。

2. 注射感染 从斜面菌株上将菌苔刮下，磨散，加无菌水定量稀释，计数后配制成欲使用浓度，常规注射、饲养 (张书方等，1980)。对照用无菌水，每头虫注射 3 微升。

3. 喂食感染 (1) 强迫喂食 将准备好的菌悬液用灭菌齐头针强迫注入蛴螬口腔，喂食后置 25—28℃ 温箱常规饲养。(2) 菌土感染 已制备好的菌粉，计数，按需要加土稀释成使用剂量，装入铝盒后，接入幼虫，置 25—28℃ 温箱饲养。(3) 饲料喂食 用斜面培养的菌株，制成均匀的悬浮液，测菌数。将粒选的花生仁表面刺孔，浸泡在菌悬液中，经三小时后取出作饲料喂食，每虫一粒，喂后置 25—28℃ 温箱培养。

强迫喂食对照用等量无菌水注入蛴螬口腔。饲料喂食对照用无菌水浸花生仁后饲喂幼虫。菌土感染对照用不加菌粉的土常规饲养。

七、观察方法

1. 观察形态用 CARL ZEISS NFPK-1 型相差显微镜和 Hitachi HU-11 型电子显微镜观察并拍照。营养体、孢囊革蓝姆染色。

2. 毒力测定 接种后 12 小时、24 小时、3 天、7、14、21 天……每周检查一次，至两个月。死虫经显微镜分析，接种菌占优势的计入感染虫数。

结 果 与 讨 论

在分离蛴螬病原过程中，从不同平皿挑选出 41 个单株，初次生长于第 1—3 种培养基的单个菌落，表面粗糙，有皱折，边缘不整齐，侧观略凸起，呈半球形，颜色乳白。培养 10 天，直径为 0.5—1.2 毫米(图版 I:1,2)，转接于第 5 种培养基，菌落变小而光滑，近圆形。营养成分不同，菌体有很大差异，菌落形态亦很不同。

侧孢芽孢杆菌曾记载是较稀少的一种芽孢菌，可能从蜜蜂幼虫、土壤和水中分离 (Bergy's 1974)。我们每次在一个平皿上能挑出的菌落只一个，或多则 2—3 个。初次生

表 1　菌株的各种特性

菌株 \ 结果 \ 项目	G反应	运动性	过氧化氢酶	厌氧生长	V-P反应	在V-P肉汤中的pH	生长温度℃ 最高	生长温度℃ 最低	生长 5% NaCl	生长 7% NaCl	生长 pH 5.7	产酸 葡萄糖	产酸 阿拉伯糖	产酸 木糖	产酸 甘露醇	水解淀粉	利用柠檬酸盐	还原硝酸盐	二羟丙酮	吲哚	苯丙氨酸脱氨	分解 酪蛋白	分解 酪氨酸	还原石蕊牛乳
0001	−	+	+	+	−	5.5	45	15	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+
0004	−	+	+	+	−	5.5	45	15	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+
0007	−	+	+	+	−	6.0	45	15	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+
0008	−	+	+	+	−	6.0	45	15	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+
0029	−	+	+	+	−	5.8	45	15	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+
0035	−	+	+	+	−	6.0	45	15	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+
侧孢芽孢杆菌	−	+	+	+	−	6.0	45	15	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	+

长后挑出的菌落再转接或扩大培养则很容易。营养体呈单或双链（图版 I:4），孢囊膨大，芽孢柱状，靠近孢囊纵轴的一边（图版 I:3，图版 II:5；），而另一边有一独木舟形伴孢体。值得注意的是：这种侧孢芽孢菌的伴孢体，在丰富培养基上可以在孢囊的任何位置出现（图版 II:6），与芽孢并列．与芽孢形成某种角度，有的在芽孢前端，与乳状菌的形状有某种相似，但在高倍相差显微镜下，则可看出不同于乳状菌；它的孢囊近于椭圆形，在已描述过的 B 型乳状菌中，无此种形态；它的孢囊中有伴孢体，而 A 型乳状菌的孢囊，基本是坛状；更重要的是，乳状菌的芽孢不易从孢囊中游离，侧孢芽孢菌的芽孢则很容易从孢囊中游离出来，这是两种芽孢菌很重要的区别点。

从分离单株中，我们选出 6 株作生化试验，结果见表 1。

以上结果反映出，从培养基上选出的这批菌株，除生长在 pH5.7 的反应不同于对照株外，其它特性与侧孢芽孢杆菌基本一致。

毒力测定结果见表 2，表 3。

虽然以往的文献尚未见过侧孢芽孢菌感染蛴螬的报道，我们挑选的培养菌株却具有一定毒力。注射感染蛴螬致病力很强，病程短。例如 0004 菌株，接种后 12 小时感染率高达 100%。感染致死的蛴螬，体表呈棕至褐色，刚死时体色稍浅，表皮不破裂，血淋巴充满营养体，蛴螬死后，营养体能继续发育，68 小时出现孢囊，至 96 小时，全部形成芽孢。寄主死后，病原能继续完成发育周期的这种特性，与乳状菌完全不同。由侧孢芽孢菌引起的疾病，与乳状菌感染蛴螬的症状也完全不同。

培养菌株，除对华北地区常见种华北大黑鳃金龟和铜绿丽金龟致病力强外，对新疆点蛀犀金龟致病力也很强，注射感染率高达 100%；对新疆金匠花金龟，注射接种也可达 33.33% 的感染率。

喂食结果反映出：培养菌株有致病力，但毒效不高，仅 3.33—13.33% 的感染率，对照菌株侧孢芽孢杆菌，菌土喂食可达 20%。0029 菌株接种后 9 天出现感染虫，0008 菌株是 20 天，0035 菌株则 24 天出现感染虫。而饵料喂食的 0029 菌株在接种后 15 天才表现感染，0035 菌株是 16 天，0008 菌株则 26 天出现感染。喂食感染时间比注射感染时间显著延长。菌土和饵料喂食方式不同，表现出致病时间不同，除蛴螬是否取食到足够引起疾病

表 2　注射致病力

时间	虫名	0001			0004			0007		
		虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率*(%)	虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)	虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)
1980	华北大黑鳃金龟									
	铜绿丽金龟	45	2×10^6	100	45	2×10^6	100	45	2×10^6	88.88
	点蛀犀金龟				20	5×10^6	100			
	金匠花金龟				30	5×10^6	33.33			
	灰粉鳃金龟									
1981	华北大黑鳃金龟	45	1×10^6	95.55	45	1×10^6	97.77	45	1×10^6	75.55
	铜绿丽金龟	30	2×10^6	93.22	30	2×10^6	96.66	30	2×10^6	93.22

* 接种后 24 小时的感染率。

表 3　喂食致病力

方法	名虫	0001			0004			0007			0008		
		虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率*(%)	虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)	虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)	虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)
菌土法	华北大黑鳃金龟										30	4.55×10^8	6.66
喂食法	华北大黑鳃金龟										30	17.66×10^8	6.66
迫食菌液	华北大黑鳃金龟	10	3×10^{10}	0	10	3×10^{10}	20	10	3×10^{10}	0	10	3×10^{10}	0
迫食营养液	华北大黑鳃金龟												
	铜绿丽金龟												

* 接种后一个月的感染率。

的病原数量这一因素外，培养菌株间也有毒力差异。

强迫口腔喂食，0004 菌株感染率为 20.00%，0029 菌株感染率达 30.00%，其余菌株均未表现感染。是这种菌不能有效地通过消化道到达血腔形成感染呢，还是未能食入一定剂量而未致病？

1980 年我们曾用注射感染后的蛴螬作接种材料，分离出纯孢囊，配制成 2.85×10^8 芽

(1980、1981，沧州)

0008			0029			0035			侧孢芽孢菌			对照	
虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)	虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)	虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)	虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)	虫数(头)	死亡率(%)
45	1×10^6	97.77	45	1×10^6	93.33	45	1×10^6	93.33				45	0
												45	0
			10	1×10^6	100							10	0
												10	0
									15	1×10^6	100	5	0
45	1×10^6	100	45	1×10^6	48.88	45	1×10^6	100	45	1×10^6	100	45	0
30	2×10^6	100	30	2×10^6	96.66	30	2×10^6	100	30	2×10^6	93.33	30	0

(1980、1981，沧州)

0029			0035			侧孢芽孢菌			混合液			对照		
虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)	虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)	虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)	虫数(头)	剂量(芽孢/头)	感染率(%)	虫数(头)	剂量(微升)	死亡率(%)
30	2.46×10^8	13.33	30	2.06×10^8	3.33	10	4.8×10^8	20				10	3	0
30	27.33×10^8	10	30	15×10^8	6.66							10	3	0
10	3×10^{10}	30	10	3×10^{10}	0	10	3×10^{10}	0				10	3	0
						30	3×10^{10}	3.33	30	3×10^{10}	6.66	10	3	0
						30	3×10^{10}	0	30	3×10^{10}	3.33	10	3	0

孢/毫升悬液，用其浸润花生仁作饵料饲喂蛴螬，结果无一头致病。是因为这类菌株仅具次生浸染的能力而不具备病原的特性，还是微生物通过虫体后致病力有所变化？

喂食感染华北大黑鳃金龟和铜绿丽金龟幼虫致病力不高，但注射感染率却很高，反应出培养菌株如进入血腔，便有较高的毒力。过去对这种菌一直作为非致病菌的论点，需要重新评价。而喂食致病力不高，是由于某种致病条件不具备呢？还是它所产生抗生素抑

制了疾病的发生？尚待进一步研究。

培养菌株的生理生化反应，除生长在 pH5.7 的反应与对照侧孢芽孢菌不同外，其它指标基本一致。

培养菌株过氧化氢酶阳性，与过氧化氢酶阴性的乳状菌有根本的区别，虽然它们的形态学特征有某种相似，但完全可以区分开。培养菌株的芽孢极易从孢囊中游离出来，被感染寄主死亡后，微生物在尸体中仍能继续完成发育周期等特性，与乳状菌完全不同。

McCray (1917) 作为偶然的次生侵染原分出过。而 Zatula 等 (1976) 从泌尿病患者分离的 712 株芽孢杆菌中也有一株 *Bacillus laterosporus*。Tabbara等 (1977) 曾从受伤病人的眼球末端眼睛晶体液中分离过 *B. laterosporus*，用这分离株接种兔子眼睛，表现眼疾。他们认为这种菌在条件合适时，可能引起疾病。从分离和感染试验反应出，侧孢芽孢菌作为次生侵染原是可能的。Shoji 等 (1976) 从侧孢芽孢菌的肉汤培养中分出一种新抗生素，命名为 laterosporamine，实验证明，这种抗生素对 G^+ (*Bacillus subtilis, Bacillus anthracis, Staphylococcus aureus, Streptococcus penumoniae, Streptococcus pyogenes*) 以及 G^- (*E. coli, Klebsiella penumoniae, Salmonella typhi, Pseudobacterium aerofaciens*) 等体内外细菌有活性，并认为它是一种非肽结构。我们认为：虽然从侧孢芽孢菌培养物中分离过抗生素，但也曾从患病动物的代谢物中分出过具侵染力的菌株。尽管侧孢芽孢菌对蛴螬有一定毒力，它又可能在土壤中存在，对地下害虫，尤其取食土壤的害虫，在条件适合时也可能致病。但是，如要使用这种菌株，必需作安全试验，因可能对脊椎动物有毒性。

参　考　文　献

张书方、崔景岳等 1980 我国主要蛴螬对乳状菌的敏感性。昆虫学报 **23**(2)：178—83。

Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons. 1974 Bergey's manual of determinative bacteriology, Eighth Edition. p. 531—41.

Fitz-James and Young. 1958 Morphological and chemical studies of the spores and parasporal bodies of *Bacillus laterosporus. J. Biophys Biochem Cytol.* 4: 639—49.

Gordon R. E. et al. 1973 The genus *Bacillus. U. S. Dep. Agr. Handbook.* No. 427.

McCray A. H. 1917 Spore-forming bacteria of the apiary. *J. Agr. Research.* 8: 410.

Shoji J., R. Sakazak. et al. 1976 Isolation of a new antibiotic: laterosporamine. *J. Antibiot.* **29**(4) 309—93.

Smith N. R., R. E. Gordon. et al. 1946 Aerobic mesophilic sporeforming bacteria. *U. S. Dep. Agr. Publ.* **559**: 1—112.

Tabbara K. F., Juffal F. et al. 1977 *Bacillus laterosporus* endophthalmitis *Arch. Ophthalmol.* (Chicago) **95**(12): 2187—9.

White G. F. 1912 The cause of European foul brood. *U. S. Dep. Agr. Bur. Entomol. Circ.* **157**: 1—15.

Zatula D. G., S. P. Reznik, et al. 1976 Bacteria of genus Bacillus isolated from patients with urological diseases. *Microb. Zh.* **38**(4): 483—9.

EXPERIMENTS OF THE PATHOGENICITY OF *BACILLUS LATEROSPORUS* AGAINST WHITE GRUBS

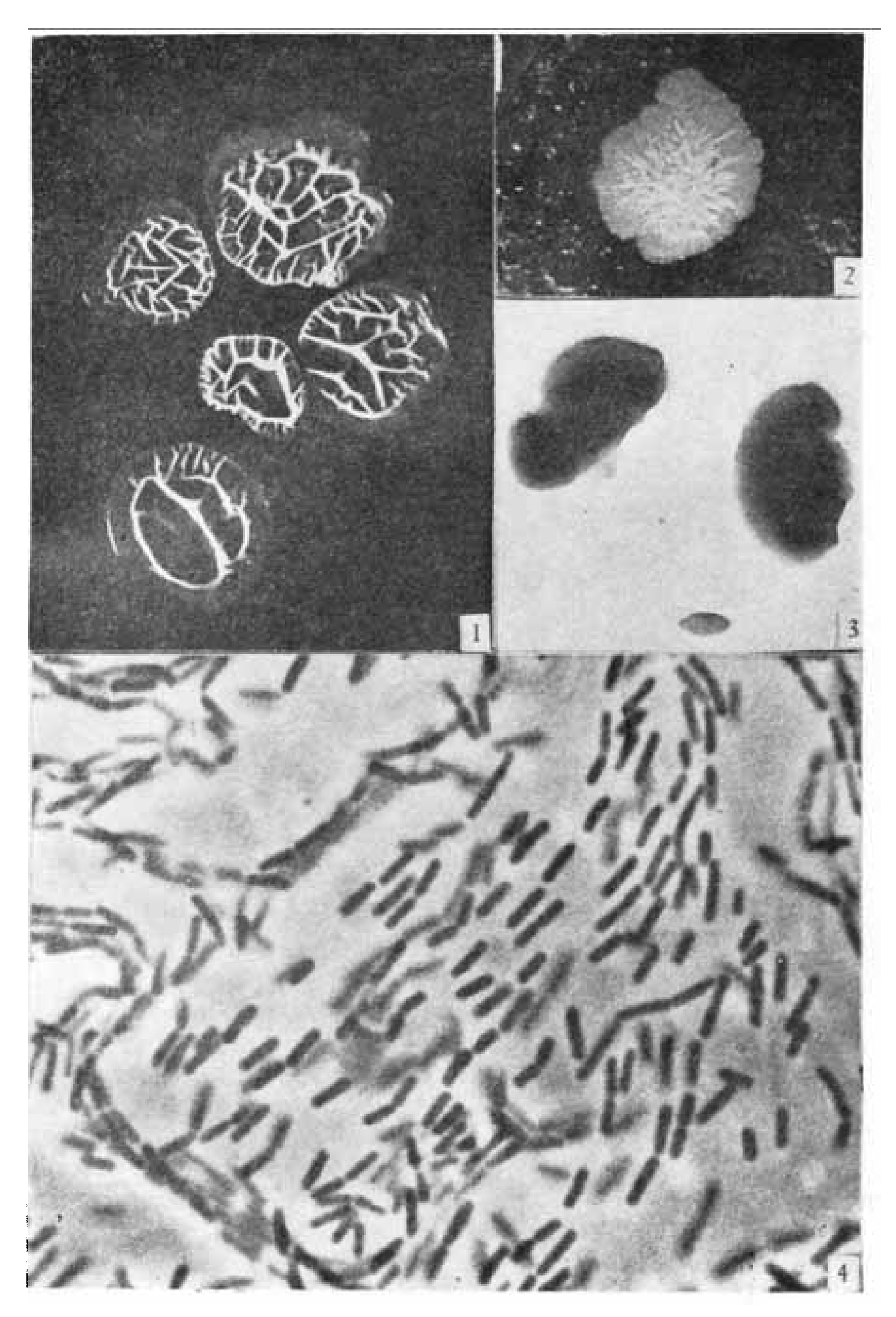
CHANG SHU-FANG WAN YU-LING

(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

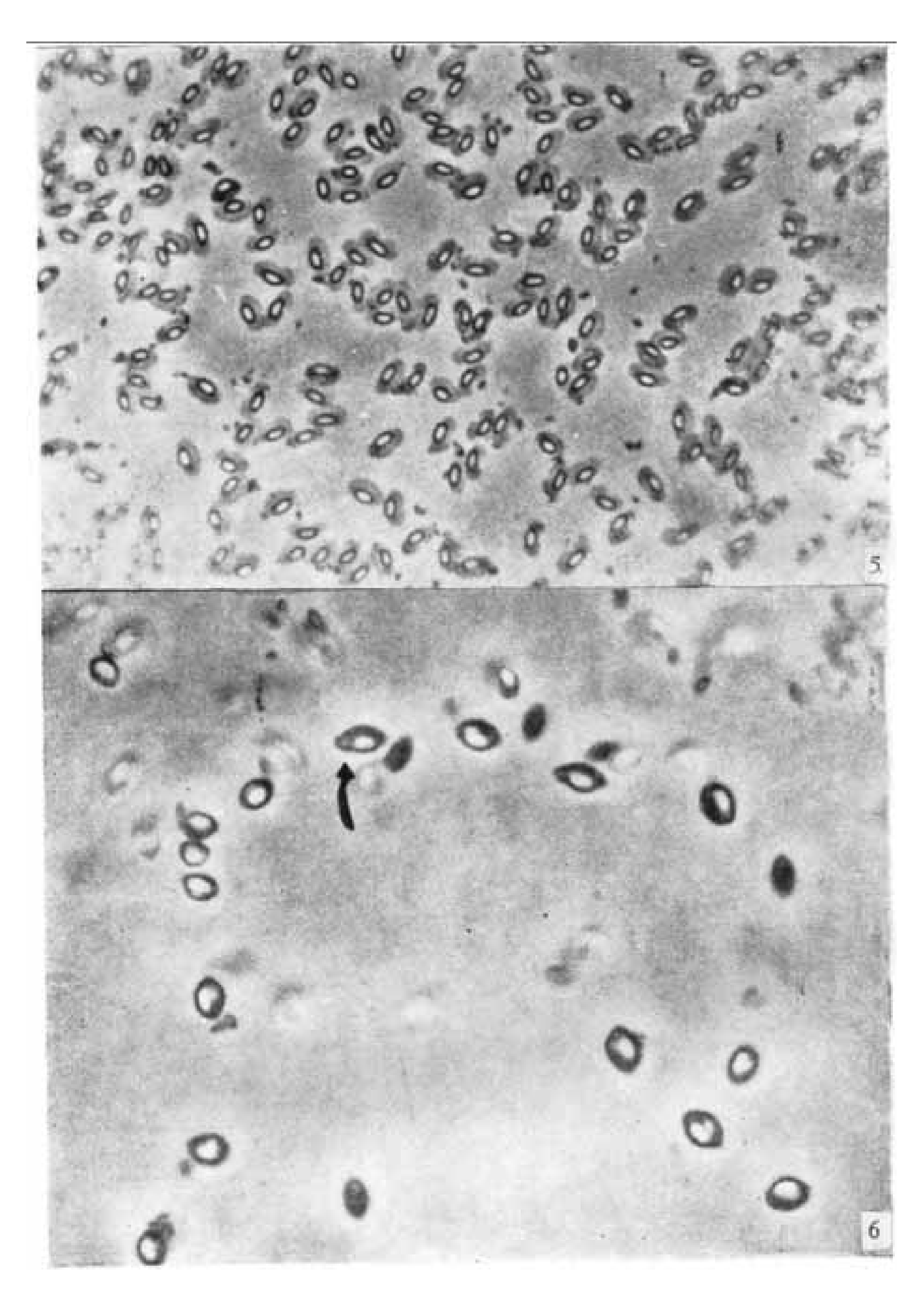
CUI JING-YUE WANG BAO-SHENG

(*Institute of Agriculture, Cang-zhou District, Hepei Province*)

Some strains were isolated when we cultured *Bacillus popilliae* in the laboratory. Their physiological and biochemical characters were identical with *Bacillus laterosporus*. The characteristics of the strains differ from that of *Bacillus popilliae*. The percentage of infection of these strains against the *Holotrichia oblita* Fald. and *Anomala corpulenta* Mots. reached 90—100% by injecting and also had certain toxicity by feeding.



1.改良 Wyss 平皿培养 10 天菌落形态 ×20
2.血琼脂平皿培养 14 天菌落形态 ×20
3.培养菌株的孢囊形态 ×40,000（电镜）
4.平皿培养的营养体 ×2,268（相差）



5.培养菌株的孢囊形态 × 3,150（相差）
6.培养菌株的伴孢体在孢囊中的位置 × 6000（相差）
（↑示此种形态与乳状菌孢囊有某些相似）